

半夏 3 种花叶病毒的 mRT-PCR 鉴定及遗传进化分析

李锦超¹, 董俊美¹, 孟义江², 杨太新¹, 葛淑俊¹

(1. 河北农业大学 农学院 / 教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 生命科学学院 / 教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071000)

摘要: 半夏 (*Pinellia ternata*) 因长期无性繁殖导致病毒病高发。本研究以河北安国疑似病毒感染的半夏为材料, 通过优化扩增反应体系及反应程序, 建立了可以同时检测黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)、大豆花叶病毒 (Soybean mosaic virus, SMV) 和芋花叶病毒 (Dasheen mosaic virus, DsMV) 的多重 RT-PCR 体系, RNA 稀释 10^6 倍时亦能同时检测 3 种病毒。对侵染病毒外壳蛋白进行基因克隆和遗传进化分析, 结果表明 CMV 的外壳蛋白编码区序列为 657 bp, 与浙江侵染半夏的 CMV (DQ399550.1) 序列相似性高达 96.16%, 与感染其他寄主的病毒序列差异较大; SMV 和 DsMV 外壳蛋白序列分别为 843 和 828 bp, 与同种株系遗传变异度分别达到 0.38 和 0.37 以上, 独立为 1 个进化支。生物信息学统计分析发现, 病毒外壳蛋白序列高度保守, 具有较为丰富的变异位点, 碱基转换率大于颠换率, CMV AT 偏倚度大于 GC, SMV、DsMV 与之相反。研究结果为半夏病毒检测和脱毒提供了技术和理论基础。

关键词: 半夏; 花叶病毒; 多重 RT-PCR; 遗传进化

中图分类号: S432.4⁺1

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

文献标识码: A



mRT-PCR identification and genetic evolution analysis of mosaic viruses in three *Pinellia ternata*

LI Jinchao¹, DONG Junmei¹, MENG Yijiang², YANG Taixin¹, GE Shujun¹

(1. College of Agronomy, Hebei Agricultural University/Key Laboratory of Crop Germplasm Resources research and Utilization in North China, Ministry of Education, Baoding 071000, China; 2. College of Life Science, Hebei Agricultural University/Key Laboratory of Crop Germplasm Resources research and Utilization in North China, Ministry of Education, Baoding 071000, China)

Abstract: The incidence of viral disease is high in *Pinellia ternata* due to long-term asexual reproduction. In this study, a multiplex RT-PCR system was established to detect Cucumber mosaic virus (CMV), Soybean mosaic virus (SMV) and Dasheen mosaic virus (DsMV) simultaneously in pinellia that was suspected of virus infection in Anguo, Hebei Province. After optimizing the amplification reaction system and reaction procedure, three viruses could be detected at the same time when the RNA was diluted 10 million times. The genes encoding the viral coat protein were cloned and their genetic evolution were analyzed. The results showed that the CMV coat protein (CP) was encoded

收稿日期: 2022-10-23

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21); 河北省现代农业产业技术体系中药材产业创新团队 (HBCT201806201, HBCT201806202)。

第一作者: 李锦超 (1997—), 男, 河北廊坊人, 硕士研究生, 从事药用植物种质资源研究与利用。E-mail: stitch_ljc@163.com

通信作者: 葛淑俊 (1970—), 女, 河北滦县人, 博士, 教授, 从事药用植物种质资源鉴定和育种。E-mail: gshj@hebau.edu.cn

本刊网址: <http://hauxb.hebau.edu.cn>

by a sequence of 657 bp that was 96.16% similar to the CMV (DQ399550.1) sequence isolated from virus infected Pinaceae from Zhejiang Province and significantly different from virus infected other hosts. The sequences encoding the coat proteins of SMV and DsMV were 843 bp and 828 bp. Their genetic variation of other SMV and DsMV was above 0.38 and 0.37, and they were in an independent clade in the phylogenetic tree. Statistical analysis of the CP sequences showed that the virus coat protein sequences included highly conserved domains and regions with abundant mutation sites in which base conversion rate was higher than inversion rate, and the AT skew was greater than GC for CMV that was opposite in SMV and DsMV. The results will provide a technical and theoretical basis for virus detection and detoxification of *Pinellia ternata*.

Keywords: *Pinellia ternata*; mosaic virus; multiple RT-PCR; genetic evolution

半夏 (*Pinellia ternata*) 为天南星科半夏属植物, 始载于《神农本草经》, 列为下品, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结等功效^[1], 是中医临床上治疗湿痰咳嗽的要药^[2], 现代毒性及药理研究证明半夏还具有抗肿瘤作用^[3]。

半夏采用无性繁殖方式, 在生长期极易受各类病毒的侵染, 并通过局部进化、寄主转变、混合侵染和远距离传播等产生新型病毒, 形成连续性、扩散性病毒病害, 防治策略复杂、难度很大^[4]。有研究表明侵染半夏的主要是花叶病毒, 以黄瓜花叶病毒、芋花叶病毒、魔芋花叶病毒 (Konjac mosaic virus, KoMV)、烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 以及大豆花叶病毒为主^[5], 可单一侵染或复合侵染, 感染率呈明显的区域性分布, 引起花叶、皱缩和矮化等症状, 致使产量下降, 品种退化^[6]。黄瓜花叶病毒为雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员, 是世界上寄主范围最广、危害最严重的植物病毒之一, 在 1 000 多种植物中均有 CMV 侵染状况的发现^[7]; 大豆花叶病毒是马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 的成员之一, 寄主范围较窄, 在世界所有大豆产区均有发生, 给大豆产量和种子质量造成巨大损失^[8]; 芋花叶病毒为马铃薯 Y 病毒属成员, 是世界上天南星科植物的重要病毒病原, 寄主多达 16 属以上^[9]。

河北省半夏种植面积大, 范围广, 在多年无性繁殖中病毒感染率较高, 其中复合侵染率约为 60%^[10]。本课题组前期已鉴定出其侵染病毒主要是 CMV、SMV、和 DsMV, 为提高鉴定效率, 本研究

拟通过调节影响 PCR 反应的各因素, 建立稳定高效的多重 RT-PCR (Multiplex RT-PCR, mRT-PCR) 病毒检测体系, 并克隆病毒外壳蛋白 (Coat protein, CP) 序列进行生物信息学分析, 以明确其遗传特征及系统进化特点, 为半夏病毒病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

在河北省安国市中药都药博园半夏种植区, 将具有花叶、皱缩、畸形、黄化、坏死等症状的疑似病毒病的单株, 采集幼嫩叶片置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 半夏总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成 称取 0.1 g 半夏叶片, 加入液氮充分研磨至粉末状, 迅速转至无 RNase 的 1.5 mL 无菌 eppendorf 管中。总 RNA 提取按照康为世纪 OminiPlant RNA Kit (DNase I) 说明书执行。cDNA 反转录参照康为世纪 HiFiScript cDNA Synthesis Kit (cDNA 第一链合成试剂盒) 说明书执行。

1.2.2 多重 RT-PCR 体系的建立 根据 GenBank 已收录的花叶病毒外壳蛋白序列设计特异性引物, 选取目的片段长度分别为 CMV 489 bp、SMV 376 bp、DsMV 271 bp 的引物序列 (表 1)。对反应体系中各引物浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合酶浓度, 以及 PCR 反应程序退火温度、延伸时间、循环数进行优化。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测目的条带的亮度和清晰度。

表 1 半夏多重 RT-PCR 检测的病毒特异性引物序列

Table 1 Sequence of virus specific primers detected by mRT-PCR in *Pinellia ternata*

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5' → 3')	引物长度 /bp Length	Tm 值 /℃ Tm	产物大小 /bp Product size	引物结合位点 Primer binding site	参考株登录号 sequence GenBank ID	Reference
CMV-F	GTCCTGTCGAGCAACTTTC	20	59.5	489	100 ~ 119	AY600989.1	
CMV-R	CGTCTCGAGTGCATCGTCTT	20	60.0		588 ~ 569		
SMV-F	GTGTGGGTGATGATGCATGG	20	59.0	376	388 ~ 407	X63771.1	
SMV-R	GATTCACGTCCCTTGACAGTG	20	59.0		763 ~ 744		
DsMV-F	CACTAGGGCTACCCACACAC	20	59.5	271	941 ~ 960	EU420058.1	
DsMV-R	TTCAATGTAGGCCTCTGCCG	20	60.0		1 211 ~ 1 192		

1.2.3 多重 RT-PCR 体系灵敏度检测 将 RNA 依次稀释 10^3 、 10^6 倍, 比较单重 RT-PCR 体系和多重 RT-PCR 体系进行检测, 电泳后检测目的条带。

1.2.4 病毒外壳蛋白的基因序列比对 根据 3 种病毒 CP 序列, 利用 Primer Premier 5 设计特异引物 (表 2) 进行扩增, PCR 产物送北京中科希林生物科技有限责任公司测序。测序结果进行 Blast 比对, 确认为 CMV、SMV、DsMV 外壳蛋白基因序列。收集 NCBI 登录的 3 种侵染病毒的外壳蛋白编码区序列, 通过 MEGA11.0、MEME 进行核苷酸序列比对, 统计 T、C、A、G 碱基含量 (AT 偏倚度 = $(A-T)/(A+T)$, GC 偏倚度 = $(G-C)/(G+C)$), 分析序列保守域及多态性位点。分别以与 CMV 同属的花生矮化病毒 (Peanut stunt virus, PSV) CP 序列 (Genbank ID: D00668), 以及与 SMV、DsMV 同属的马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 和 KoMV (Genbank ID: M95491, MN369533) 作为外群, 构建系统进化树。

表 2 半夏 3 种花叶病毒 CP 蛋白扩增引物序列

Table 2 Full length primer sequence for amplification of *Pinellia ternata* virus

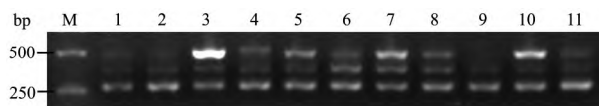
引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5' → 3')	引物长度 / bp Length	Tm 值 /℃ Tm
CMVcp-F	GAAATTGCGTTCTGTCTACT	20	49.5
CMVcp-R	GGATTCAAACCTGGGAGC	17	49.6
SMVcp-F	GACAGGTGAGGACTTGG	17	49.5
SMVcp-R	CCTAACCTTTACTGTGG	17	44.6
DsMVcp-F	GCTGGAAAACAAGAGG	16	43.4
DsMVcp-R	GCAACACCAAGCAATG	16	43.4

2 结果与分析

2.1 多重 RT-PCR 检测结果

mRT-PCR 因在 1 个 PCR 体系中检测多种病毒, 因病毒种类不同, 反应体系中引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、酶浓度、退火温度、dNTPs 浓度和反应条件较单重

RT-PCR 有较大差别, 设定不同浓度梯度进行测试。最终确定半夏 mRT-PCR 病毒检测反应体系: cDNA $1 \mu L$, SMV ($10 \mu mol/L$) 上、下游引物各 $0.3 \mu L$, CMV ($10 \mu mol/L$)、DsMV ($10 \mu mol/L$) 正向和反向引物各 $0.5 \mu L$, Mg^{2+} 浓度 $1.5 mmol/L$, dNTPs 浓度 $0.3 mmol/L$, $10 \times$ PCR Buffer $2 \mu L$, Taq DNA 聚合酶浓度 $0.05 U/L$, 加 ddH_2O 补足至 $20 \mu L$ 。反应程序: $94^\circ C$ 预变性 $5 min$; $94^\circ C$ 变性 $30 s$, $52.9^\circ C$ 退火 $30 s$, $72^\circ C$ 延伸 $70 s$, 31 个循环; $72^\circ C$ 延伸 $10 min$, $4^\circ C$ 终止反应。通过田间多样品试验检测, 多重 RT-PCR 体系重现性良好 (图 1)。



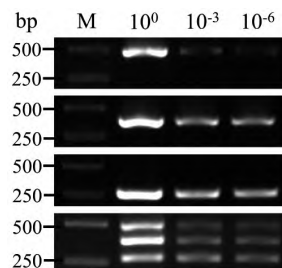
注: M: Marker DL 2000; 1 ~ 11: 不同半夏田间样品。

图 1 半夏 mRT-PCR 反应体系田间样品检测

Fig. 1 mRT-PCR reaction system for field detection of *Pinellia*

2.2 多重 RT-PCR 体系灵敏度测定

将半夏病株 RNA 稀释后分别进行单重 RT-PCR 和多重 RT-PCR, 两者对稀释到 10^{-6} 的样品均能扩增出条带, 但多重 RT-PCR 中 CMV 显示条带亮度高于单重 RT-PCR (图 2), 并且 3 条目的条带清晰可见, 颜色深浅较为一致, 灵敏度高, 经济高效。



注: M: Marker DL 2000; A: CMV; B: SMV; C: DsMV; D: 优化多重 RT-PCR。

图 2 单重 RT-PCR 与 mRT-PCR 体系灵敏度比较

Fig. 2 Comparison of sensitivity of single RT-PCR and mRT-PCR systems

2.3 病毒外壳蛋白序列遗传进化分析

克隆获得 CMV 全长及 SMV、DsMV 部分 CP 序列 (命名为 CMV-BX、SMV-BX、DsMV-BX, Genbank: MW354674、MW364642、MW364641), 长度分别为 657、843 和 828 bp, 进行序列结构和遗传进化分析。

2.3.1 外壳蛋白序列碱基组成分析 对国内 18 条来自不同地区或不同侵染植物的 CMV 外壳蛋白编码区序列, 进行碱基组成特点分析, T、C、A、G 4 种碱基平均含量分别为 27%、26.5%、22.7%、23.7%, G+C 含量为 50.3%, 稍高于 A+T 含量 (49.7%)。从碱基使用偏好性来看, CMV CP 偏好使用碱基 T, GC 偏倚度均大于 AT。将 CMV 所有片段序列对齐后, 基因序列间无终止密码子和移码突变, 氨基酸的编码从第 1 位碱基开始, 长度为 657 bp 的基因序列共编码 218 个氨基酸 (表 3)。

对收集到的 9 条国内 SMV CP 序列进行生物信息学分析 (表 4), T、C、A、G 4 种碱基平均含量分别为 22.7%、18.5%、33.4%、25.5%, A+T 含量为 56%, 高于 G+C 含量 (44%), SMV CP 偏好使用碱基 A, AT 偏倚度明显大于 GC。将 SMV 序列对齐后, 克隆到的长度为 808 bp 的 SMV 部分外壳蛋白序列序列间有个别核苷酸的插入或缺失现象, 共编码 269 个氨基酸。相似的是, 国内外 7 条 DsMV CP 序列中, T、C、A、G 4 种碱基平均含量分别为 22.9%、21.7%、32.6%、22.8%, A+T 含量为 55.5%, 高于 G+C 含量 (44.5%) (表 5), DsMV CP 同样偏好使用碱基 A, AT 偏倚度也明显大于 GC。长度为 832 bp 的 DsMV 外壳蛋白核苷酸序列共编码 277 个氨基酸, 基因序列间存在插入或缺失现象。

表 3 CMV CP 编码序列碱基组成特点

Table 3 Base composition characteristics of CMV CP coding sequence

代号 Code name	来源地区 Rgion	侵染植物 Infect plants	碱基含量 /% Base content				AT 偏倚度 AT skew	GC 偏倚度 GC skew	登录号 GenBank ID
			T	C	A	G			
CMV-BX	中国河北	半夏	28.4	25.7	23.4	22.5	-0.025 99	-0.015 38	MW354674
China:Anhui	中国安徽	黄瓜	27.2	26.6	22.2	23.9	-0.024 85	-0.013 84	KU175641.1
China:Beijing	中国北京	红豆	26.8	26.9	22.8	23.4	-0.019 64	-0.017 64	KJ467817.1
China:Chengdu	中国成都	西红柿	26.5	26.8	22.7	24	-0.018 71	-0.013 93	DQ302718.1
China:Chongqing	中国重庆	烟草	26.9	26.8	22.2	24	-0.023 2	-0.013 93	EF183505.1
China:Gansu	中国甘肃	苹果	26.8	26.3	23.1	23.7	-0.018 24	-0.012 96	KP307921.1
China:Guangdong	中国广东	番茄	26.5	27.2	22.8	23.4	-0.018 01	-0.019 29	DQ302719.1
China:Guangzhou	中国广州	辣椒	27.4	26.3	22.8	23.4	-0.022 94	-0.014 39	EU429567.1
China:Hebei	中国河北	苹果	26.2	27.2	22.4	24.2	-0.018 48	-0.015 66	KP307922.1
China:Jiangsu	中国江苏	番茄	27.1	26.5	22.4	24	-0.023 34	-0.012 31	DQ302720.1
China:Shanghai	中国上海	番茄	27.5	26	22.2	24.2	-0.026 51	-0.009 17	DQ302721.1
China:Sichuan	中国四川	-	26.9	26.2	22.5	24.4	-0.021 83	-0.009 23	KP641344.1
China:Hubei	中国湖北	芋	26.8	26.8	22.5	23.9	-0.021 02	-0.014 66	KF564789.1
China:Jilin	中国吉林	辣椒	27.4	26.2	22.5	23.9	-0.024 32	-0.011 43	GU979890.1
China:Shandong	中国山东	花生	26.9	26.8	22.7	23.6	-0.021 15	-0.016 1	GQ228529.1
China:Shanxi	中国山西	西葫芦	26.9	26.8	22.2	24	-0.023 2	-0.013 93	JQ700201.1
China:Taiwan	中国台湾	沙漠玫瑰	27.4	26	22.8	23.7	-0.022 94	-0.011 36	AB667971.1
China:Xinjiang	中国新疆	中华辣椒	26.8	26	23.6	23.6	-0.016 1	-0.012 08	KC576805.1
China:Zhejiang	中国浙江	半夏	26.8	26.8	23.6	22.8	-0.016 1	-0.019 64	DQ399550.1
平均值			27	26.5	22.7	23.7	-0.021 4	-0.014 05	

表 4 SMV CP 编码序列碱基组成特点

Table 4 Base composition characteristics of SMV CP coding sequence

代号 Code name	来源地区 Region	侵染植物 Infect plants	碱基含量 /% Base content				AT 偏倚度 AT skew	GC 偏倚度 GC skew	登录号 GenBank ID
			T	C	A	G			
SMV-BX	中国河北	半夏	23.7	21.4	33.0	21.9	0.052 72	0.002 21	MW364642
China: Sichuan	中国四川	大豆	21.9	18.6	33.5	26.0	0.064 05	0.033 14	MH389896.1
China:Beijing	中国北京	-	22.8	18.1	33.1	26.0	0.057 61	0.034 99	X63771.1
China:Henan	中国河南	半夏	22.8	17.9	34.5	24.8	0.067 37	0.029 06	AJ628755.1
China:Hubei	中国湖北	半夏	22.8	17.8	34.5	24.9	0.067 37	0.030 12	AJ628754.1
China:Nanjing 1	中国南京	大豆	23.5	17.2	32.8	26.4	0.052 45	0.040 08	HQ396722.1
China:Nanjing 2	中国南京	大豆	22.4	18.4	33.3	25.9	0.060 98	0.033 42	KR065507.1
China:Nanjing 3	中国南京	-	22.6	18.1	32.5	26.8	0.054 05	0.038 97	DQ517432.1
China:Shanghai	中国上海	半夏	21.9	18.9	34.2	25.0	0.068 69	0.026 64	AJ628751.1
China:Shanxi	中国山西	豇豆	22.4	18.4	32.3	26.9	0.054 37	0.038 73	KC896416.1
平均值			22.7	18.5	33.4	25.5	0.059 97	0.030 74	

表 5 DsMV CP 编码序列碱基组成特点

Table 5 Base composition characteristics of DsMV CP coding sequence

代号 Code name	来源地区 Region	侵染植物 Infect plants	碱基含量 /% Base content				AT 偏倚度 AT skew	GC 偏倚度 GC skew	登录号 GenBank ID
			T	C	A	G			
DsMV-BX	中国河北	半夏	22.3	17.9	35.0	24.8	0.072 57	0.029 88	MW364641
China:Hubei	中国湖北	芋	23.0	22.3	32.5	22.3	0.052 74	0.000 00	JN692173.1
China:Yunnan	中国云南	半夏	24.4	20.9	33.4	21.3	0.052 33	0.001 55	EU420058.1
China:Zhejiang	中国浙江	马蹄莲	21.9	23.3	32.0	22.8	0.054 36	-0.002 22	NC003537.1
India 1	印度	紫柄芋	23.0	21.8	31.4	23.9	0.045 71	0.009 88	HQ207542.2
India 2	印度	疣柄魔芋	23.2	22.6	31.7	22.5	0.046 87	-0.000 54	HQ207529.2
Japan	日本	魔芋	22.6	22.2	32.1	23.1	0.051 93	0.003 81	LC114493.2
Nicaragua	尼加拉瓜	芋	23.1	22.5	32.6	21.8	0.052 97	-0.003 20	AM910403.1
平均值			22.9	21.7	32.6	22.8	0.053 68	0.004 90	

2.3.2 外壳蛋白序列保守与变异位点分析 保守域分析结果显示, CMV、SMV、DsMV 核苷酸序列各发掘出 3 段长度为 50 bp 的高度保守片段 (图 3), 可作为研究外壳蛋白结构、功能保守和演化关系的特定序列。经统计, 19 条 CMV 对比序列中共发现核苷酸变异位点 151 个, 简约变异位点 93 个, CMV-BX 与其他基因序列碱基替换模式中, 转换

明显高于颠换 (表 6), R 值 ($R=si/sv$) 为 2.5。碱基转换主要发生于 TC 之间, 占转换碱基总数的 63.3%, AG 之间的转换占 46.7%; 碱基颠换主要发生在 TA 之间, 占颠换碱基总数的 36.3%, 依次是 TG (27.3%)、CA (27.3%)、CG (9.1%)。上述碱基的突变共造成 30 个氨基酸多态性位点, 12 处简约变异位点。

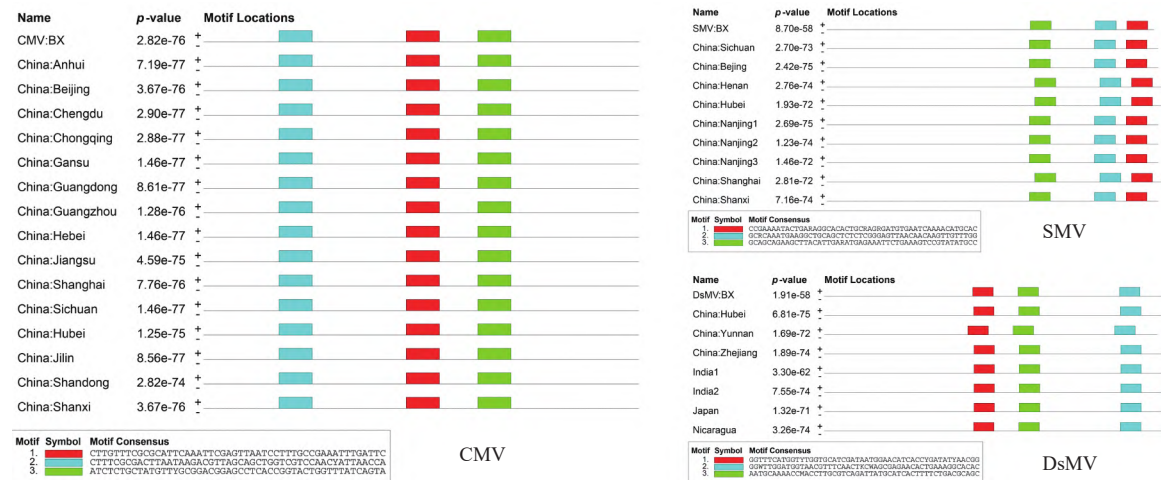


图 3 3 种花叶病毒 CP 核苷酸保守序列分析

Fig.3 Analysis of conserved sequences of CP nucleotide of three mosaic viruses

SMV 对比序列中共存在核苷酸变异位点 344 个, 简约变异位点 190 个, 转换明显高于颠换, R 值为 2.0, 碱基转换主要发生于 AG 之间, 占转换碱基总数的 57.5%, TC 之间的转换占 42.5%; 碱基颠换主要发生在 TA 之间, 占颠换碱基总数的 33.3%, 依次是 CA (27.8%)、TG (22.2%)、CG (16.7%)。

DsMV 中, 对比序列共发现变异位点 453 个, 简约变异位点 213 个, 转换率同样明显高于颠换率, R 值为 1.1, AG 转换碱基占总数的 58%, TC 之间的转换占 42%; 碱基颠换主要发生在 CA 之间, 占颠换碱基总数的 35.8%, 依次是 TA (30.2%)、TG (15%)、CG (15%) (表 6)。

表 6 3 种病毒 CP 编码序列碱基替换模式

Table 6 Base substitution pattern of CMV CP coding sequence

	位点 Domain	碱基转换 si	碱基颠换 sv	R 值 R value	碱基替换频次 / 个 Base substitution frequency									
					TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
CMV	第一位点	5	3	1.7	45	4	1	0	50	1	0	50	1	68
	第二位点	1	1	2.4	57	1	0	0	67	0	0	58	1	35
	第三位点	24	8	2.8	62	14	3	3	46	2	1	33	9	44
	总计	30	12	2.5	164	19	4	3	163	3	1	140	11	148
SMV	第一位点	62	25	2.5	56	15	5	3	26	2	2	45	15	50
	第二位点	16	10	1.7	31	2	1	1	39	1	0	89	5	80
	第三位点	9	9	1.0	65	0	0	0	52	2	0	91	4	38
	总计	87	43	2.0	153	17	6	4	117	5	3	225	23	168
DsMV	第一位点	65	53	1.2	46	15	11	6	32	8	4	42	17	39
	第二位点	22	21	1.0	35	3	2	2	40	6	2	82	8	75
	第三位点	16	19	0.8	64	3	3	1	60	5	2	85	5	31
	总计	103	93	1.1	145	21	16	8	132	19	8	209	29	145

2.3.3 外壳蛋白序列系统进化分析 通过构建分子系统进化树, 发现 3 种病毒外壳蛋白序列与同种株系相似度较高, 亲缘关系相近。在 CMV 系统进化树的 4 个二级分支中 (图 4), CMV-BX 与来自浙江的 CMV 株系聚类为一簇, 侵染植物同为半夏, 并且侵染半夏的株系与来自江苏、上海的侵染番茄的 CMV 株系亲缘关系较近。在四级分支中, 北京、

山东、山西、吉林的 CMV 株系聚为一簇, 台湾、广东、湖北另成一簇, 在 CMV 遗传进化中可能存在地理差异。在 SMV、DsMV 进化树 (图 4) 中, SMV-BX、DsMV-BX 独立出来, 与其他株系均未组成一簇, 但就亲缘关系来看, 各株系关系相近, 2 种病毒各株系间地理或物种差异不明显。

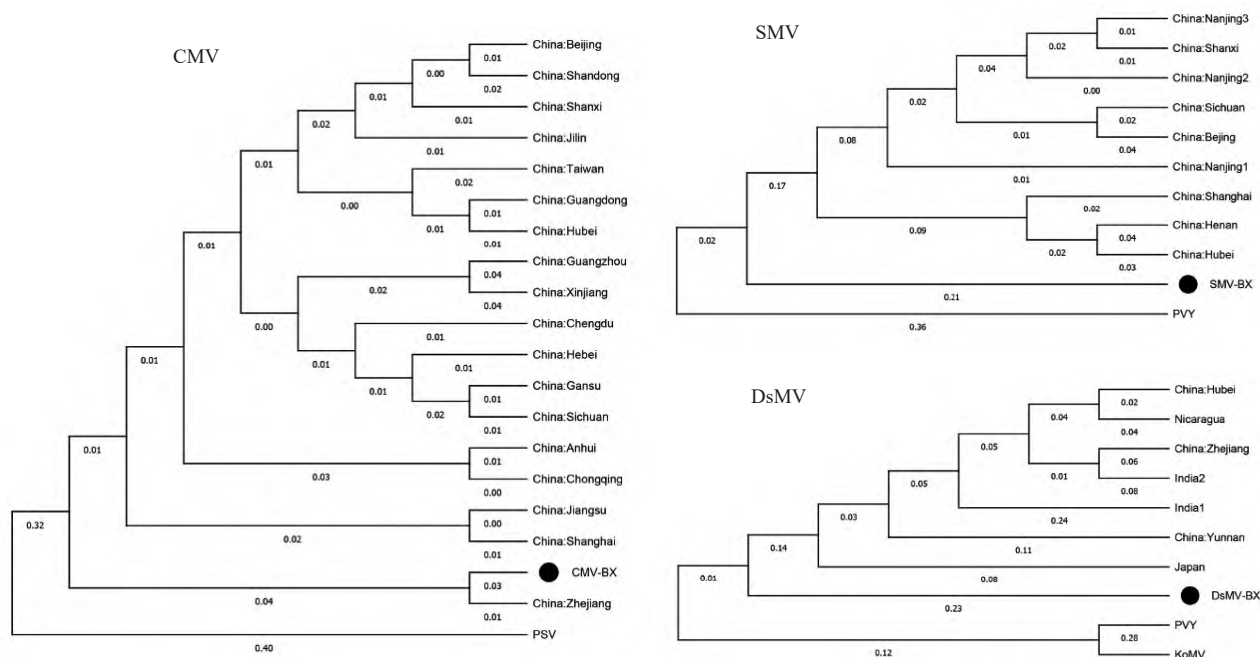


图 4 3 种花叶病毒 CP 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of three mosaic viruses

3 结论与讨论

现有的植物病毒检测方法中, 分子生物学技术具备高水平的行业标准化及可重复性和再现性, PCR 及其衍生技术广泛应用于病毒病的病原物鉴定^[11]。植物病毒多为 RNA 病毒, 将 RNA 反转录成 cDNA 后通过 PCR 扩增进行病原检测, 此方法为 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 鉴定^[12], 而 mRT-PCR 技术可实现在一个体系中同步扩增多个目的片段。对于多重 PCR 而言, 成功的关键是不同引物的相对浓度、PCR 各物质的浓度、退火温度和模板浓度之间的平衡^[13], 其准确性受试剂和操作人员变异性的影响很大^[14]。目前, 草莓 4 种病毒^[15]、甘薯 8 种病毒^[16]、葡萄 9 种病毒^[17]等 mRT-PCR 检测体系已建立, 广泛应用于植物病毒的批量检测, 经济高效。

CMV 是典型三分体正链 RNA 病毒, 是侵染我国半夏的主要植物病毒之一^[18]。CMV CP 由 RNA3 的 3' 端 ORF 编码, 与病毒粒子的装配、蚜虫传播及寄主的症状表现相关^[19]。Vijay^[20]发现病毒外壳蛋白中第 129 位突变为不同氨基酸替代物后, 导致病毒感染引起的症状严重程度发生变化。本研究通过序列分析发现, 我国多地区的 CMV 外壳蛋白核苷酸含有 151 个多态性位点, 碱基转换率大于碱

基颠换率, 这可能是造成不同株系侵染程度或寄主范围不同的原因。通过遗传进化分析, 侵染半夏的 CMV-BX 在系统进化树中单独聚为一类, 寇丽莎^[21]研究结果表明, 中山西柴胡 CMV-SXCH 序列与大多数 CMV 中国分离物为一类, 而付尚松^[22]在辣椒中分离的 CMV 株系仅在贵州地区就存在丰富变异, 说明 CMV CP 基因同源性高低与寄主、地区关系不大, 具有高自然变异特点^[23]。

病毒外壳蛋白基因是一个高度保守的区域, 氨基酸序列差异越大, 致病性反应相差就越大^[24]。SMV CP 序列系统发育研究表明, 寄主植物与遗传多样性之间存在一定的相关性^[25]。施世明^[26]通过克隆 91 份芋样品中的 DsMV CP 序列, 分析发现分离物的系统进化关系与其地理来源无显著相关性。本研究中, SMV 与 DsMV 的 AT 含量均高于 GC 含量, 基因序列间有个别核苷酸的插入或缺失现象, 变异位点较多, 碱基转换率高于颠换率, 分离物与其他收集株系亲缘关系相近, 但独立成一簇。由此可见, 根据寄主的不同, 2 种病毒通过改变自身序列特征来达到侵染的目的, 而各株系间地理差异不明显。

本研究建立了可准确鉴定侵染半夏的 3 种花叶病毒的高灵敏度 mRT-PCR 检测体系, CP 基因序列分析明确了 CMV、SMV 和 DsMV 存在较丰富的变异位点, 为半夏病毒防治和无病毒苗生产提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会, 药典一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:123.
- [2] 杨冰月, 李敏, 敬勇, 等. 半夏及其炮制品化学成分及功效的差异研究 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4349–4355.
- [3] 董鑫, 徐伟玲, 申俊丽, 等. 生半夏在恶性肿瘤治疗中的研究与应用 [J]. 中医药学报, 2019, 47(4): 106–108.
- [4] 叶健, 龚雨晴, 方荣祥. 病毒—昆虫—植物三者互作研究进展及展望 [J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(8): 845–855.
- [5] 崔丽艳, 庞小静, 齐永红, 等. 利用小 RNA 深度测序技术鉴定半夏病毒病原 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(12): 1334–1341.
- [6] 刘舟, 彭秋平, 向云亚, 等. 我国常见药用植物病毒病的危害与防控 [J]. 植物保护, 2018, 44(1): 9–19.
- [7] Sárany R, Fábrián A, Palkovics L, et al. The 28 Ser Amino Acid of cucumber mosaic virus movement protein has a role in symptom formation and plasmodesmata Localization [J]. Viruses, 2021, 13(2): 222.
- [8] Kristin W, Mazen A, Kook-Hyung K. Soybean resistance to soybean mosaic virus [J]. Plants, 2020, 9(2): 219.
- [9] Babu B, Hegde V. Molecular characterization of Dasheen mosaic virus isolates infecting edible aroids in India [J]. Acta Virologica, 2014, 58(1): 34–42.
- [10] 刘文洪, 陈集双, 李永伟. 侵染天南星科植物病毒的分子鉴定及其生态学研究 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(4): 566–570.
- [11] Neil B, Jan K, Stephan W, et al. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing [J]. Virus Research, 2014, 186: 20–31.
- [12] Pallás V, Sánchez-Navarro J A, James D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2087.
- [13] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 504–511.
- [14] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2002, 29(1): 23–39.
- [15] Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(2): 85–93.
- [16] Kwak H R, Kim M K, Shin J C, et al. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex rt-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses [J]. The Plant Pathology Journal, 2014, 30(4): 416–424.
- [17] Gambino G, Gribaudo I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control [J]. Phytopathology, 2006, 96(11): 1223–1229.
- [18] 张华荣. 侵染半夏的黄瓜花叶病毒研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [19] 杨磊, 张建平, 孙鑫, 等. 黄瓜花叶病毒 RNA3 基因间隔区的功能研究 [J]. 病毒学报, 2020, 36(5): 913–922.
- [20] Vijay Q K B, Rituraj P. Structural changes induced by substitution of amino acid 129 in the coat protein of Cucumber mosaic virus [J]. Genomics, 2020, 112(5): 3729–3738.
- [21] 寇丽莎, 赵慧琪, 王德富, 等. 药用植物柴胡病毒病原物的分子鉴定 [J]. 病毒学报, 2017, 33(4): 610–616.
- [22] 付尚松, 王莉爽, 杨学辉, 等. 黄瓜花叶病毒贵州辣椒分离物外壳蛋白基因序列分析 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(1): 108–114.
- [23] 李志勇, 夏惠娟, 李兴红, 等. 北京、宁夏甜椒上分离的黄瓜花叶病毒 CP 基因序列分析及亚组鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 89–92.
- [24] 郭东全, 智海剑, 王延伟, 等. 大豆花叶病毒 5 个分离物的鉴定及外壳蛋白序列分析 [J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 218–222.
- [25] Wang Y N, Wu B L, Borth W B, et al. Molecular characterization and distribution of two strains of Dasheen mosaic virus on taro in Hawaii [J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 1980–1989.
- [26] 施世明, 王国平, 徐文兴, 等. 芋花叶病毒的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因序列分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39 (3): 509–515.

(责任编辑: 李 川)